

экспериментальной группы увеличивалось в 1,9 раза, контрольной – в 1,3 раза. Базальный уровень ТБК-активных продуктов в печени животных опытной группы понижался в 2,5 раза, в контрольной – в 1,6 раза. Интенсивность индуцированного ПОЛ в опыте уменьшалась в 2 раза, в контроле – достоверно не изменялась. Глутатионпероксидазная активность в опытной группе возрастала в 1,9 раза, в контрольной – в 1,2 раза. Каталазная активность в опытной группе увеличилась в 1,6 раза, контрольной – достоверно не изменялась.

Таким образом, внутривенное введение криоконсервированных ЭНК при экспериментальном АПП приводило к улучшению функционального состояния печени и торможению оксидативного стресса. Обсуждаются возможные механизмы лечебного действия ЭНК. Полученные результаты могут явиться основой для разработки новых методов лечения АПП.

activity in experimental group increased in 1.6 times and did not statistically and significantly change in the control.

Thus, intravenous introduction of cryopreserved ENC at experimental LAD resulted in the improvement of liver functional state and oxidative stress inhibition. Possible mechanisms of therapeutic effect of ENC are discussed. The results obtained can be the base to develop new methods for LAD treatment.

## **Исследование криозащитной активности эндоцеллюлярных криопротекторов в процессе криоконсервирования сперматозоидов собак**

М.И. ЕГОРОВ, Т.П. Линник, Т.С. ДЮБКО, А.П. БЕЛОНОЖКО  
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

### **Study of Cryoprotective Activity of Endocellular Cryoprotectants during Canine Spermatozoa Cryopreservation**

M.I. EGOROV, T.P. LINNIK, T.S. DYUBKO, A.P. BELONozhko  
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

При криоконсервировании сперматозоидов собак (СС) используется в качестве криопротектора глицерин. Низкая проникающая способность, показанная на некоторых биообъектах, может быть причиной осмотического шока, проявляющегося на спермиях собак при добавлении криозащитной среды к клеткам. Поэтому поиск альтернативного глицерину криопротектора, имеющего большую проникающую способность для данного вида клеток, является актуальной задачей.

Одним из физико-химических свойств веществ, способствующих высокой проникающей способности криопротекторов через мембраны, является их гидрофобность, характеризующаяся коэффициентом распределения в системе вода-неполярная фаза. В наших исследованиях были изучены криопротекторы с различным значением этого коэффициента. Исследовали криозащитную активность этиленгликоля, диметилсульфоксида, N,N-диметилформамида (DMFA), 1,2-пропандиола в концентрации 1 М в сравнении с глицерином. Кроме этого, была предложена криозащитная среда, содержащая вместо желтка куриных яиц яичный альбумин в концентрации 1%. Установлено, что самая высокая жизнеспособность СС как до, так и после криоконсервирования наблюдалась под защитой DMFA.

Для выяснения возможного механизма влияния яичного альбумина на жизнеспособность СС было исследовано взаимодействие альбумина с клетками, отмытыми от спермальной плазмы в среде, не содержащей ни желтка куриных яиц, ни белка, а также с модельными мультислойными липосомами из яичного фосфатидилхолина. Для этого применяли ковалентно меченый флуоресцентным красителем Tasman Green-404

During cryopreservation of canine spermatozoa (CS) glycerol is used as cryoprotectant. Low penetrating ability shown in some biological objects could be the reason of osmotic shock manifesting in canine spermatozoa when adding cryoprotective media to cells. Therefore search for a cryoprotectant as an alternative with higher penetrating ability for certain type of cells is an actual task.

One of physical and chemical properties of substances contributing to a high penetrating ability of cryoprotectants via membranes is their hydrophobicity characterizing with distribution coefficient in water-non-polar phase system. Our researches dealt with cryoprotectants with different values of this coefficient. There was investigated cryoprotective activity of ethylene glycol, dimethyl sulfoxide, N,N-dimethylformamide (DMFA), 1,2-propanediol under 1M concentration in comparison with glycerol. In addition there was proposed the cryoprotective medium containing 1% egg albumin instead of chicken egg yolk. The highest CS viability was established to be observed both before and after cryopreservation under DMFA protection.

To reveal a possible effect mechanism of egg albumin on CS viability there was researched the interaction of albumin and cells washed out of sperm plasma in the medium without both chicken egg yolk and white as well as with model multilayer liposomes derived from egg phosphatidyl choline. For this purpose there was used egg albumin which was covalent-labeled fluorescent dye Tasman Green-404 (TG-404) and obtained from the Institute of Single Crystals of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

DMFA and ethylene glycol having higher when comparing with glycerol permeability coefficient via cell

(TG-404) яичный альбумин, полученный в Институте монокристаллов НАН Украины.

Показано, что ДМФА и этиленгликоль, имеющие больший в сравнении с глицерином коэффициент проницаемости через мембраны клеток, проявляют высокую криозащитную активность в отношении СС и не оказывают на них существенного цитотоксического действия, что позволяет рассматривать эти вещества как перспективные криопротекторы для низкотемпературного хранения СС. Выявлено, что замена желтка куриных яиц в составе среды на яичный альбумин не снижает жизнеспособность СС в процессе криоконсервирования. Лучшие результаты после замораживания-оттаивания СС получены при сочетании в криозащитной среде 1 М ДМФА с 1%-м яичным альбумином. Установлен факт взаимодействия флуоресцентно меченого яичного альбумина с искусственными липидными мембранами.

membranes have been shown to manifest a high cryoprotective activity in respect of CS and do not cause a significant cytotoxic effect on them, that enables to consider these substances as perspective cryoprotectants for low temperature storage of CS. It was revealed that the substitution of chicken egg yolk as the part of the medium to egg albumin did not reduce viability of CS during cryopreservation. The best results after CS freeze-thawing were obtained when combining 1M DMFA with 1% egg albumin in cryoprotective medium. The fact of interaction of fluorescent-labeled egg albumin with artificial lipid membranes was established.

## Изменение спектральных характеристик белков плазмы донорской крови под влиянием озона

Е.В. СОМОВА

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Changes in Spectral Characteristics of Donor Blood Plasm Proteins under Ozone Effect

E.V. SOMOVA

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

Изучение молекулярных механизмов действия озона на компоненты крови представляет интерес в связи с развитием методов озонотерапии.

Цель работы – изучение влияния малых доз озона на спектральные характеристики белков плазмы донорской крови и функциональное состояние сывороточного альбумина человека (САЧ).

Плазму крови выделяли центрифугированием (800 g, 10 мин) из цельной крови здоровых доноров. Содержание белка и нуклеотидов измеряли спектрофотометрически по поглощению в УФ-области (А.П.Демченко, 1981). Общее содержание САЧ в плазме измеряли по поглощению при длине волны 640 нм с использованием стандартного набора реактивов “Альбумин-Агат” с бромкрезоловым зеленым (Россия), индекс токсичности САЧ ( $T = (ОКА/ЭКА) - 1$ ) – набора “Зонд” (“Серум-Альфа”, Россия). Концентрацию озона оценивали спектрофотометрическим методом на приборе Specord UV VIS (Германия) по поглощению света на полосе Хартли. Озонированный физиологический раствор (ОФР) получали на установке с генератором озона барьерного типа, сконструированной в ИПКиК НАН Украины. Физиологический раствор (0,89% NaCl, pH 7,2) во флаконе объемом 200 мл барботировали озон-кислородной смесью, концентрация растворенного озона в ОФР 3,8 мг/л. Растворение озона и дальнейшее хранение ОФР для замедления процесса распада озона проводили в термостате со льдом. Плазму смешивали с ОФР непосредственно после озонирования.

Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Триптофановую флуоресценцию белков плазмы возбуждали светом с

Studying molecular mechanisms of ozone effect on blood components is of interest because of ozone therapy methods development.

The work was aimed to investigate the effect of low ozone doses on spectral characteristics of donor blood plasm proteins and functional state of human serum albumin (HSA).

Blood plasm was isolated by centrifuging (800 g, 10 min) from healthy donor whole blood. Protein and nucleotide content was measured spectrophotometrically by absorption in UV-area (A.P. Demchenko, 1981). HSA total content in plasm was measured by absorption at 640 nm wavelength using the “Albumin-Agat” standard kit of reagents with bromocresol green (Russia), HSA toxicity index ( $T = (OCA/ECA) - 1$ ) was done with “Zond” kit (“Serum-Alpha”, Russia). Ozone concentration was evaluated spectrophotometrically with Specord UV VIS device (Germany) by light absorption on Hartley band. Ozonized physiological solution (OPS) was obtained using the device with barrier-type ozone generator, designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. Physiological solution (0.89% NaCl; pH 7.2) in 200 ml flask was bubbled by ozone-oxygen mixture, concentration of dissolved ozone in OPS made 3.8 mg/l. Ozone dissolution and further OPS storage for inhibiting the ozone decay process was carried-out in thermostat with ice. Plasm was mixed with OPS right after ozonizing.

Fluorescence spectra were estimated with Cary Eclipse (Varian) Spectrofluorimeter. Tryptophan fluorescence of plasm proteins was light-excited at 296 nm. Absorption spectra were recorded with Perkin Elmer (USA) spectrophotometer.